

## 不同修饰磁纳米颗粒提取 DNA 对 HRM 基因分型能力的影响探讨\*

张敏<sup>1</sup>, 张俊平<sup>2</sup>, 杨美娟<sup>1</sup>, 李凌霄<sup>2</sup>, 郜莉娜<sup>1</sup>, 沈明辉<sup>1</sup>, 尤崇革<sup>1△</sup>

(1. 兰州大学第二医院检验医学中心, 甘肃兰州 730030; 2. 中国科学院兰州化学物理研究所, 甘肃兰州 730030)

**摘要:**目的 评价不同修饰基团的磁性纳米颗粒提取的基因组 DNA 对高分辨熔解曲线(HRM)进行 SNP 基因分型能力的影响。方法 以商品化硅基质吸附柱提法基因组 DNA 提取试剂盒为对照, 评价二氧化硅(SiO<sub>2</sub>)、壳聚糖(CTA)修饰磁珠及四氧化三铁(Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)裸核磁珠 DNA 的提取得率及纯度; 针对 rs12641369G>A, rs3114018C>A, rs2302515C>G 3 个 SNP 位点, 分别取上述方法提取的 DNA 作为模板进行 PCR-HRM 检测; 以 Sanger 测序作为“金标准”, 评价检测的灵敏度和特异度; 通过重复性实验评价其重复性和再现性。结果 4 种方法 DNA 提取质量的比较结果显示, SiO<sub>2</sub>@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 法提取得率与离心柱法相当, 且差异无统计学意义( $P>0.05$ ); CTA@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 法及 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 法 DNA 提取得率均比柱提法低, 差异有统计学意义( $P<0.01$ )。灵敏度和特异度实验结果显示, 除 2 例样本的熔解曲线均发生漂移接受复查外, 其余标本 3 个位点均可直接基因分型; 4 种核酸提取方法的最终分型结果灵敏度和特异度均达到 100%。批内和批间重复试验均显示重复性和再现性良好; 柱提法 3 个位点野生型与纯合突变型样本熔解峰 T<sub>m</sub> 值的变异系数在 0.6%~0.8%; SiO<sub>2</sub>@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 法 3 个位点野生型与纯合突变型样本熔解峰 T<sub>m</sub> 值的变异系数在 0.5%~0.8%; CTA@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 法 3 个位点野生型与纯合突变型样本熔解峰 T<sub>m</sub> 值的变异系数在 0.5%~0.8%; Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 法 3 个位点野生型与纯合突变型样本熔解峰 T<sub>m</sub> 值的变异系数在 1.2%~1.5%。结论 本研究自建的 3 种 DNA 磁珠法提取体系对 PCR-HRM 检测结果的影响很小, 可对 rs12641369G>A, rs3114018C>A, rs2302515C>G 3 个 SNP 位点进行常规化基因分型, 且具备良好的检测性能, 具有一定的临床应用价值。

**关键词:**磁固相萃取技术; 高分辨熔解曲线; 基因分型; 检验性能; 单核苷酸多态性

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2019.11.003

**中图分类号:**R394.8

**文章编号:**1673-4130(2019)11-1293-05

**文献标识码:**A

## Effects of different modified magnetic nanoparticle of the extracted DNA on HRM genotyping capability\*

ZHANG Min<sup>1</sup>, ZHANG Junping<sup>2</sup>, YANG Meijuan<sup>1</sup>, LI Lingxiao<sup>2</sup>,  
GAO Lina<sup>1</sup>, SHEN Minghui<sup>1</sup>, YOU Chongge<sup>1△</sup>

(1. Laboratory Medicine Center, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou, Gansu 730030, China; 2. Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou, Gansu 730030, China)

**Abstract: Objective** To evaluate the effect of genomic DNA extracted from magnetic nanoparticles prepared by different modifying groups on the SNP genotyping capability of high resolution melting(HRM) technique. **Methods** The yield and purity of DNA extracted from silica(SiO<sub>2</sub>), chitosan(CTA) modified magnetic beads and ferric oxide bare nuclear magnetic beads were evaluated by the centrifugal column DNA extraction kit of Tiangen company. For the three SNP sites of rs12641369 G>A, rs3114018 C>A, rs2302515 C>G, the DNA extracted by the above methods was taken as the template for PCR-HRM detection. Sanger sequencing was used as the gold standard to evaluate sensitivity and specificity. Repeatability and reproducibility were evaluated by repeated experiments. **Results** The results showed that the yield of SiO<sub>2</sub>@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> was comparable to that of the centrifugal column method, and the difference was not statistically significant( $P>0.05$ ). The rates of nucleic acid extraction by CTA@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> were lower than those by centrifugal column method( $P<0.01$ ). The results of 3 loci showed that all the samples could be directly genotyped except for 2 samples whose melting curves were all drifting for review. The sensitivity and specificity of the four nucleic acid

\* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81560343); 甘肃省兰州市城关区科技计划项目(2016-1-3)。

作者简介: 张敏, 女, 检验技师, 主要从事分子生物学方向的研究。△ 通信作者, E-mail: youchg@lzu.edu.cn。

本文引用格式: 张敏, 张俊平, 杨美娟, 等. 不同修饰磁纳米颗粒提取 DNA 对 HRM 基因分型能力的影响探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(11): 1293-1297.

extraction methods were 100%. Repeated tests at three sites showed good repeatability and reproducibility. The coefficient of variation of  $T_m$  (melting temperature) between wild and homozygous mutant samples of three loci were between 0.6% and 0.8%; The coefficient of variation of  $T_m$  (melting temperature) between wild-type and homozygous mutant samples by  $\text{SiO}_2 @ \text{Fe}_3\text{O}_4$  of three SNPs were between 0.5% and 0.8%. The coefficient of variation of  $T_m$  between wild type and homozygous mutant samples by  $\text{CTA} @ \text{Fe}_3\text{O}_4$  method was between 0.5% and 0.8%, respectively. The variation coefficients of  $T_m$  values of fusion peaks of wild and homozygous mutant samples by  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  method were between 1.2% and 1.5%, respectively. **Conclusion** The three self-established DNA magnetic bead extraction systems in this study have little impact on the PCR-HRM detection results, and can be used to classify the three SNPs, including rs12641369G>A, rs3114018C>A, and rs2302515C>G, which have good detection performance and certain clinical application value.

**Key words:** magnetic solid phase extraction technology; high resolution melting curve; genotyping; testing performance; single nucleotide polymorphism

高分辨溶解曲线 (HRM) 作为一种新兴的分子诊断技术, 其不受突变位点和突变类型的限制, 特异度和灵敏度高, 操作简便, 目前已被广泛地用于生物学及医学各个领域研究<sup>[1-5]</sup>。由于 HRM 检测的高灵敏性, 其对核酸质量的要求也相对较高。磁固相萃取技术 (MSPE) 由于其快速、高效以及易于自动化的特点引起了越来越多的关注<sup>[6-10]</sup>。在 MSPE 中, 避免了产生可能导致核酸降解的离心步骤, 减少物理或化学因素对核酸的损害, 同时, 作为固相吸附剂的磁性颗粒 (MNP) 可以通过施加外部磁场而被很容易地除去<sup>[11-12]</sup>。为此, 本研究制备并建立了 3 种基于磁珠的核酸提取方法, 分别以 3 种突变位点及突变类型 (rs12641369G>A, rs3114018C>A, rs2302515C>G) 为例, 探讨其对 PCR-HRM 检测的影响, 并评价检验性能。

## 1 材料与方法

**1.1 标本来源** 40 例全血标本来自兰州大学第二医院体检中心健康人群, 平行采用天根公司的全血基因组 DNA 试剂盒、 $\text{SiO}_2 @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 、 $\text{CTA} @ \text{Fe}_3\text{O}_4$  及  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  提取 300  $\mu\text{L}$  全血。

**1.2 主要试剂与仪器** 六水合氯化铁 ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )、无水乙酸钠 (NaAc)、乙二醇、聚乙二醇 10000、聚乙二醇 6000 和无水氯化钠 (天津大茂化学试剂厂), 正硅酸乙酯、壳聚糖 (天津科密欧化学试剂公司), 缓冲液 CL (北京天根公司), 洗脱液 (日本富士公司), Taq DNA 聚合酶和 SYTO13 染料 (美国 Life Technologies 公司), dNTP (美国 Invitrogen 公司), Rotor-Gene Q PCR 仪 (德国 QIAGEN 公司), Nanodrop 2000 超微量分光光度计 (美国 Thermal Scientific 公司)。

## 1.3 方法

**1.3.1 磁珠制备** 首先采用水热法制备了羧基改性磁性  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米粒子。 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (1.35 g) 溶于乙二醇 (40 mL), 借助于超声波处理形成澄清溶液; 再将 NaAc (3.6 g) 和聚乙二醇 10000 (1.0 g) 加入到溶液中, 剧烈搅拌混合物直至获得均匀的深黄色溶液; 将

该溶液放入聚四氟乙烯高压反应器中, 在 200  $^{\circ}\text{C}$  条件下加热 48 h; 产物用乙醇和水洗涤数次, 并在 60  $^{\circ}\text{C}$  的氮气条件下干燥 10 h 备用, 最后得到  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米粒子。取 250 mg  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  颗粒加入 30 mL 乙醇超声 30 min; 向烧杯中加入 30 mL 乙醇、60 mL 乙醇胺及 5.28 g 超纯水, 并搅拌均匀; 将上述液体与  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  颗粒溶液混匀后放入三口烧瓶, 边搅拌边滴加 2 mL 正硅酸乙酯 (500 r/min), 再将转速调至 800 r/min, 机械搅拌 6 h, 最后洗涤干燥, 得到  $\text{SiO}_2 @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 。1 g  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  颗粒加入一定量超纯水超声 1 h, 再加入 100 mL 1% 壳聚糖溶液 (1% 醋酸溶液稀释) 机械搅拌 24 h, 取 150 mg 上述颗粒加入 4 mL 2.5% 戊二醛溶液 (0.2 mol/L 磷酸盐溶液配制), 200 r/min 机械搅拌 5 h, 洗涤干燥得到  $\text{CTA} @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 。

**1.3.2 核酸提取** 柱提法核酸提取按照天根公司试剂说明书步骤进行。向 300  $\mu\text{L}$  EDTA- $\text{K}_2$  抗凝血液中加入 300  $\mu\text{L}$  无菌去离子水以破坏红细胞膜, 混合数次后, 将混合液以 12 000 r/min 离心 3 min, 弃去上清液; 在剩余的沉淀中加入缓冲液 CL (300  $\mu\text{L}$ ), 混合数次; 将混合物以 12 000 r/min 离心 1 min, 弃去上清液; 制备 150 mL 蛋白酶 K-缓冲液 FG 混合液 (1:100) 并加入到沉淀中, 倒转几次, 直至沉淀物完全溶解; 将离心管放入 65  $^{\circ}\text{C}$  金属浴中温浴 10 min; 向上述裂解液中加入 300  $\mu\text{L}$  结合溶液 (20% PEG, 4 mol/L 氯化钠, pH=2.0), 随后加入 40 ng  $\text{SiO}_2 @ \text{Fe}_3\text{O}_4$  /  $\text{CTA}2 @ \text{Fe}_3\text{O}_4$  /  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ; 室温下静置 10 min; 在磁力分离架上分离结合物, 弃去上清液。结合物用 70% 乙醇溶液洗涤 2 次并在室温下干燥。加入 50  $\mu\text{L}$  洗脱液并在室温下温育 10 min。最后磁分离, 将洗脱液转移至新管。

**1.3.3 DNA 质量评价** DNA 提取产物中取 1  $\mu\text{L}$  用超微量蛋白核酸检测仪测定浓度、A260 及 A280, 计算得率 (浓度  $\times$  洗脱液体积) 和纯度 (A260/A280)。

**1.3.4 引物设计与合成** 使用 NCBI 数据库在线软件 Primer-BLAST 设计引物, 并使用在线工具 UN-Afold 和 uMelt 进行引物验证, 引物由南京金思特

(GenScript) 科技有限公司合成, 引物序列信息见表 1。

表 1 3 个 SNP 位点的引物信息表

SNP	引物序列(5'→3')	GC(%)	产物长度(bp)
rs12641369	P1:AAA AAC ACC AAC CCC TGA TG	45	139
	P2:GGC ATG CAT TTC AGC AAT AG	45	
rs3114018	P1:TAC TGC CAT CCC CAT TTG AT	45	107
	P2:TCC GTC TTG AGT CAG TGA GC	55	
rs2302515	P1:CTC CAG GAC AAG AAC CAG GTG ATG	54.2	130
	P2:GGA AGA TCT GGC GAA GCT CAG G	59.1	

**1.3.5 PCR-HRM 基因分型** 反应体系 10  $\mu$ L, 包括 1  $\mu$ L DNA 样本, 10 $\times$ PCR Buffer 1  $\mu$ L, 0.08  $\mu$ L Taq DNA 聚合酶(浓度 5 U/ $\mu$ L), 10 mmol/L dNTP 0.2  $\mu$ L, 20  $\mu$ mol/L 引物各 0.25  $\mu$ L, 10 $\times$ SYTO 13 染料 0.5  $\mu$ L, 50 mmol/L 的 MgCl<sub>2</sub> 0.05  $\mu$ L, 最后加 water-DEPC 至 10  $\mu$ L。rs12641369 和 rs3114018 反应条件为预变性 95  $^{\circ}$ C 5 min, 变性 95  $^{\circ}$ C 10 s, 退火 58  $^{\circ}$ C 15 s, 延伸 72  $^{\circ}$ C 15 s, 共 15 个循环; 变性 95  $^{\circ}$ C 10 s, 退火 56  $^{\circ}$ C 15 s, 延伸 72  $^{\circ}$ C 15 s, 共 25 个循环。rs2302515 反应条件为预变性 95  $^{\circ}$ C 5 min, 变性 95  $^{\circ}$ C 10 s, 退火 60  $^{\circ}$ C 15 s, 延伸 72  $^{\circ}$ C 15 s, 共 40 个循环。随后进行 HRM 分析, 条件为 95  $^{\circ}$ C 1 min, 40  $^{\circ}$ C 1 min, 熔解曲线温度区间为 75~85  $^{\circ}$ C, 分辨率为每梯度 0.2  $^{\circ}$ C, 通过熔解曲线峰型的改变进行基因分型。

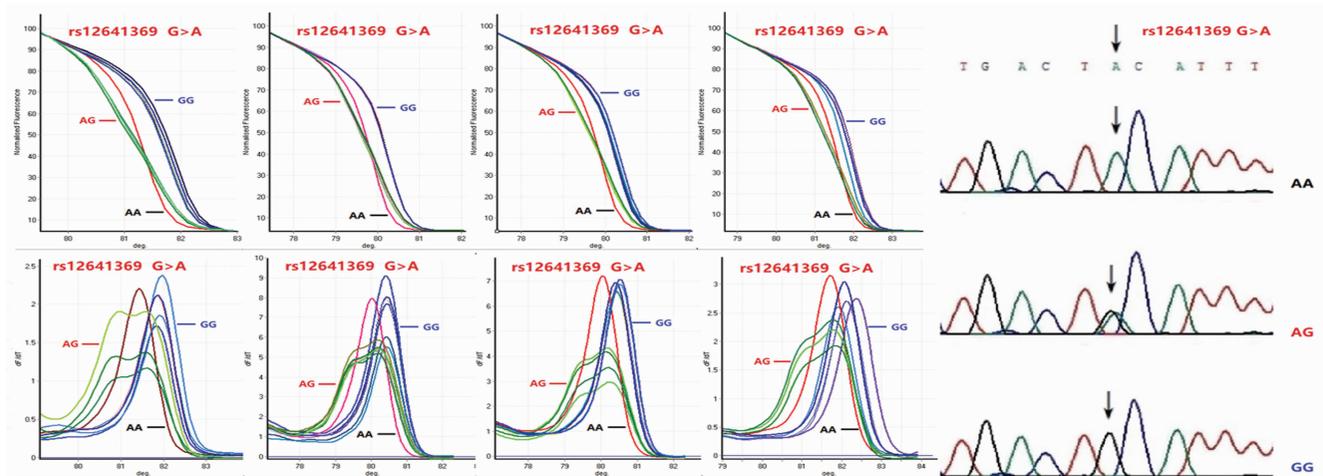
**1.3.6 检验性能的评价** 为评价灵敏度与特异度, 特定义杂合和纯合突变基因型为阳性, 野生基因型为阴性。灵敏度为真阳性占真阳性与假阴性之和的百分比, 特异度为真阳性占假阳性与真阴性之和的百分

比。重复性采用批内 10 次重复评价, 再现性采用批间重复 10 次。

**1.4 统计学处理** 使用 SPSS 22.0 软件对核酸提取得率及纯度(A260/A280)进行统计描述, 计算  $\bar{x} \pm s$ 。对 rs12641369G>A, rs3114018C>A, rs2302515C>G 的纯合基因型相应的熔解曲线 T<sub>m</sub> 值进行统计描述, 计算变异系数(CV, %)并采用独立样本 *t* 检验比较各位点野生基因型及纯合突变基因型的 T<sub>m</sub> 值差异是否具有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 DNA 提取质量比较** 如表 2 所示, 统计学分析显示以离心柱法为对照, SiO<sub>2</sub>@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 法得率与离心柱法相当, 且差异无统计学意义( $P>0.05$ ), CTA@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 法及 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 法核酸提取得率均较离心柱法低, 且差异有统计学意义( $P<0.01$ ); 5 种方法提取核酸的纯度(A260/A280 $\approx$ 1.80)之间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。PDA@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 法和 SiO<sub>2</sub>@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 法均具有良好的核酸提取质量。



注: 从左到右依次为离心柱法、SiO<sub>2</sub>@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>、CTA@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 及 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 的标准化熔解曲线图(上)和求导熔解曲线图(下); 最右侧为 rs12641369 的测序验证图

图 1 5 种核酸提取方法 rs12641369 的批量 PCR-HRM 熔解曲线图

**2.2 灵敏度和特异度** 在 40 例样本中 rs12641369、rs3114018 和 rs2302515 有 2 例标本由于熔解峰漂移,

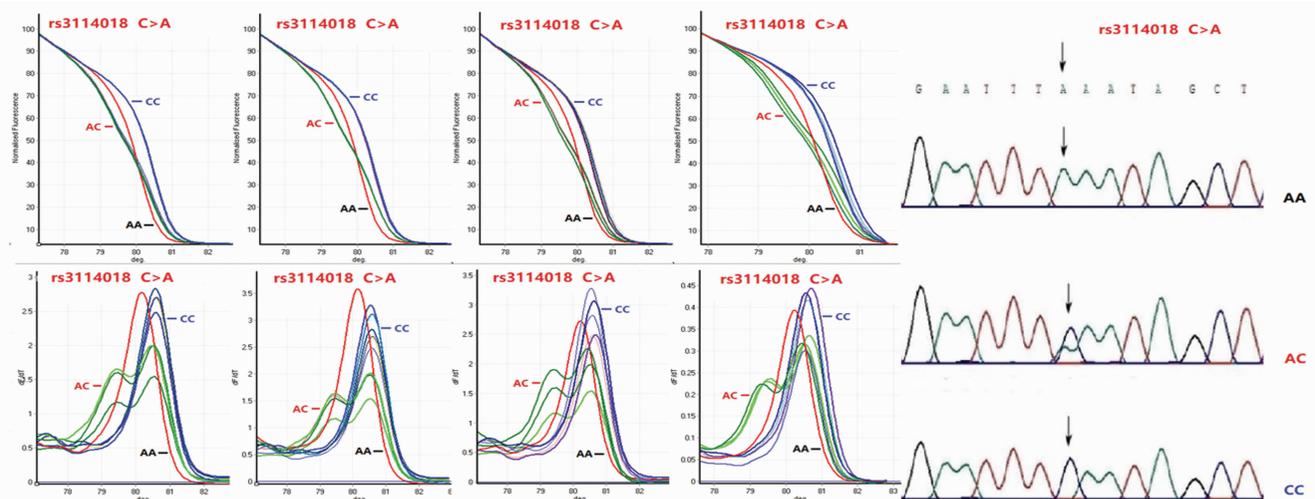
不能直接基因分型, 其余均可直接分型(如图 1~3)。这 2 例样本后经与已知纯合型样本混熔和重新检测

后均能明确分型:所有样本检测结果与 Sanger 测序结果一致,4 种核酸提取结合 HRM 方法在本次研究中灵敏度和特异度达到 100%。

表 2 4 种核酸提取方法核酸质量的比较

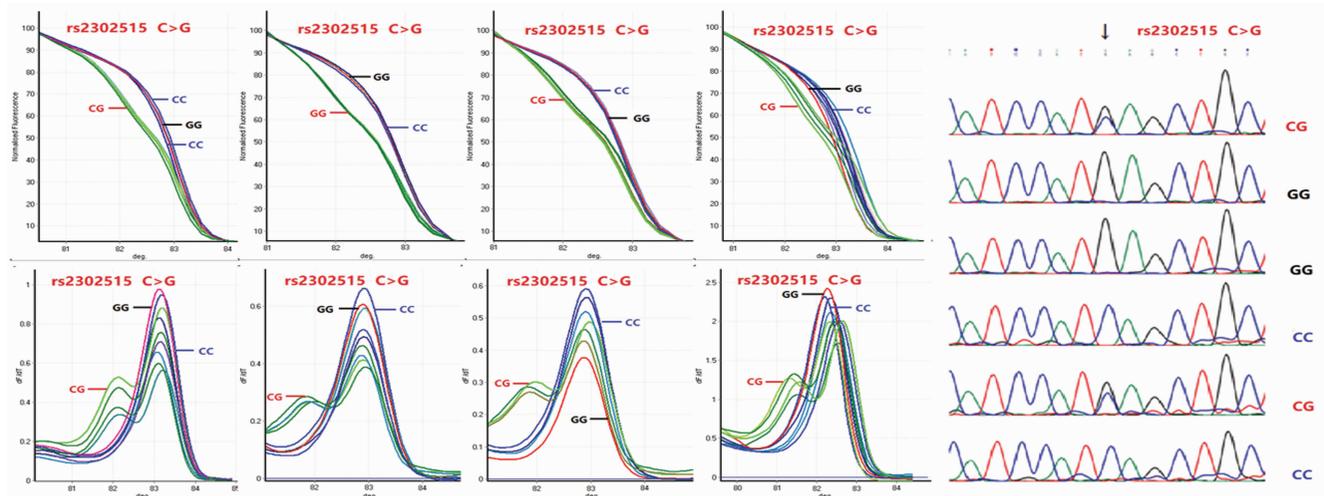
方法	得率( $\mu\text{g}/300\ \mu\text{L}$ )	<i>t</i>	<i>P</i>	A260/A280	<i>t</i>	<i>P</i>
SiO <sub>2</sub> @Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	2.89±0.26	1.05	>0.05	1.79±0.12	1.18	>0.05
CTA@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	1.65±0.33	12.68	<0.01	1.83±0.15	0.15	>0.05
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	0.86±0.25	23.92	<0.01	1.79±0.21	0.74	>0.05
柱提法	2.99±0.24	—	—	1.84±0.11	—	—

注:—表示无数据



注:从左到右依次为离心柱法、SiO<sub>2</sub>@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>、CTA@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 及 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 的标准化熔解曲线图(上)和求导熔解曲线图(下);最右侧为 rs3114018 的测序验证图

图 2 5 种核酸提取方法 rs3114018 的批量 PCR-HRM 熔解曲线图



注:从左到右依次为离心柱法、SiO<sub>2</sub>@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>、CTA@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 及 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 的标准化熔解曲线图(上)和求导熔解曲线图(下);最右侧为 rs2302515 的测序验证图

图 3 5 种核酸提取方法 rs2302515 的批量 PCR-HRM 熔解曲线图

**2.3 重复性和再现性** 在重复性实验中,离心柱法、SiO<sub>2</sub>@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 法、CTA@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 法及 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 法在 rs12641369 位点基因型 GG 对应熔解曲线的 T<sub>m</sub> 的 CV 分别为 0.6%、0.6%、0.8%和 1.2%;*t* 检验发现野生型和纯合型 T<sub>m</sub> 值差异均具有统计学意义(*P* <

0.05)。在 rs3114018 位点基因型 CC 的 T<sub>m</sub> CV 分别为 0.4%、0.8%、0.5%和 1.3%;*t* 检验发现野生型和纯合型 T<sub>m</sub> 值差异均具有统计学意义(*P* < 0.05);在 rs2302515 位点基因型 CC 的 T<sub>m</sub> CV 分别为 0.7%、0.8%、0.5%和 1.5%;*t* 检验发现野生型和纯合型

Tm 值差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。由于 rs2302515C>G 的纯合型与野生型 Tm 值极为接近,本研究通过车轮式混溶的方法区分了所有样本的基因型。再现性实验也显示,所有核酸提取方法及 SNP 位点对应的熔解曲线 Tm 值的 CV 均在 0.4%~1.5%,尽管批间的熔解曲线有轻微的波动,但不影响基因正确分型。

### 3 讨论

HRM 技术和其他 SNP 基因分型方法(限制性片段长度多态性法、Taqman 荧光探针法等)相比,不需要设计序列特异度探针,不需要 PCR 后处理,全程闭环操作,减少了污染的风险,同时还具有检测高效快速、灵敏度高、操作简单、检测费用低廉等优点<sup>[13]</sup>。但影响 HRM 检测结果准确性的因素很多<sup>[14]</sup>,除 PCR 本身反应体系外,往往忽视标本核酸模板提取对结果的影响,且较少系统评价其对检验性能的影响。目前,仅有少量文献报道运用磁性纳米颗粒提取基因组 DNA,同时,市面上所销售的磁珠法核酸分离试剂盒,大多数为国外产品,价格昂贵,很难得到广泛应用<sup>[15]</sup>。本研究对 3 种自建的基于磁珠法的 PCR-HRM 检测系统进行了方法学的性能评价,结果显示,与测序法比较,该方法的对 3 个位点(rs12641369G>A、rs3114018C>A、rs2302515C>G)分型的灵敏度和特异度均达到 100%。2 例样本在检测时存在扩增曲线异常偏离群体,原因可能与模板操作失误或模板质量有关。重复性与再现性结果表明离心柱法与磁珠法结合 PCR-HRM 进行基因分型均具有较好的批内精密度,特别是 G>A 及 C>A 突变类型能够通过熔解曲线峰型清楚地区分野生型与纯合突变型。尽管不同修饰的磁珠提取效果各有差异,但 HRM 技术对检测模板质量的轻微波动可以耐受,在检测过程中仍可保证检测结果的准确性及稳定性。

### 4 结论

本研究制备的 3 种磁性纳米颗粒( $\text{SiO}_2 @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 、 $\text{CTA} @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 、 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )均可用于核酸提取及 PCR-HRM 检测,但在提取核酸得率及检验性能方面, $\text{SiO}_2 @ \text{Fe}_3\text{O}_4$  更佳;磁珠提取结合 PCR-HRM 方法的建立有效缩短了实验时间,提高了实验效率,节省了工作成本,为后续分子生物学研究提供了理论依据。另外,本研究所制备的磁珠有望实现自动化核酸提取,从而降低手工操作带来的污染及误差。

### 参考文献

[1] GIDLOF O, BURVALL S, EDVINSSON L, et al. Complete discrimination of six individuals based on high-resolution melting of hypervariable regions I and II of the mitochondrial genome[J]. Biotechniques, 2009, 47(2): 671.

[2] MORGAN J A, WELCH D J, HARRY A V, et al. A mitochondrial species identification assay for Australian

blacktip sharks (*Carcharhinus tilstoni*, *C. limbatus* and *C. amblyrhynchoides*) using real-time PCR and high-resolution melt analysis[J]. Mol Ecol Resour, 2011, 11(5): 813-819.

- [3] SONNANTE G, GATTO A, MORGESE A, et al. Genetic map of artichoke x wild cardoon: toward a consensus map for *Cynara cardunculus*[J]. Theor Appl Genet, 2011, 123(7): 1215-1229.
- [4] REBELO A R, PARKER L, CAI H Y. Use of high-resolution melting curve analysis to identify *Mycoplasma* species commonly isolated from ruminant, avian, and canine samples[J]. J Vet Diagn Invest, 2011, 23(5): 932-936.
- [5] LI M, ZHOU L, PALAIS R A, et al. Genotyping accuracy of high-resolution DNA melting instruments [J]. Clin Chem, 2014, 60(6): 864-872.
- [6] 王念跃, 马超, 李传燕, 等. 磁性纳米颗粒  $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$  的制备及在全血 DNA 提取中的应用[J]. 临床检验杂志, 2016, 34(3): 169-172.
- [7] SHAN Z, LI X, GAO Y, et al. Application of magnetic hydroxyapatite nanoparticles for solid phase extraction of plasmid DNA[J]. Anal Biochem, 2012, 425(2): 7-125.
- [8] WANG Y, MA X D, DING C, et al. pH-responsive deoxyribonucleic acid capture/release by polydopamine functionalized magnetic nanoparticles [J]. Anal Chim Acta, 2015, 862(2): 33-40.
- [9] BAI Y L, CUI Y, PAOLI G C, et al. Synthesis of amino-rich silica-coated magnetic nanoparticles for the efficient capture of DNA for PCR[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2016, 145(2): 257-266.
- [10] HE H, LI R Q, CHEN Y, et al. Integrated DNA and RNA extraction using magnetic beads from viral pathogens causing acute respiratory infections [J]. Sci Rep, 2017, 7(12): 45199.
- [11] XU K, WANG Y Z, ZHANG H M, et al. Solid-phase extraction of DNA by using a composite prepared from multiwalled Carbon nanotubes, chitosan,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  and a poly(ethylene glycol) based deep eutectic solvent[J]. Microchimica Acta, 2017, 23(10): 4133-4140.
- [12] 吴科盛, 许恒毅, 郭亮, 等. 磁性固相萃取在检测分析中的应用研究进展[J]. 食品科学, 2011, 32(23): 317-320.
- [13] ISHIGE T, ITOGA S, MATSUSHITA K, et al. Locked nucleic acid probe enhances Sanger sequencing sensitivity and improves diagnostic accuracy of high-resolution melting-based KRAS mutational analysis[J]. Clinica Chimica Acta, 2016, 457(6): 75-80.
- [14] 尤崇革, 李玉民, 马克君, 等. 基于高分辨熔解技术进行单核苷酸多态性基因分型的方法学评价[J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版), 2012, 5(7): 1786-1790.
- [15] 许朋, 郑春辉, 孙智勇, 等. 磁珠法快速提取基因组 DNA 的实验研究[J]. 生物信息学, 2018, 16(3): 190-195.